

Daniela Baumstark, Philipp Pagel\*, Johannes Eiglsperger, Volker Pfahlert und Fritz Huber

# **NMR-Spektroskopie – ein modernes Werkzeug zur Serum-Analytik von Lipoproteinen und Metaboliten**

**NMR spectroscopy – a modern analytical tool for serum analytics of lipoproteins and metabolites**

**Zusammenfassung:** Die NMR-Spektroskopie ist eine moderne analytische Methode, die sich gut zur Analyse unterschiedlichster Körperflüssigkeiten eignet. Im Serum können neben kleinen Metaboliten auch differenziert Lipoprotein-Fraktionen bestimmt werden. Die Technik ist gut standardisierbar und erlaubt im Vergleich zur Lipoproteinfraktionierung mittels Ultrazentrifugation eine umfassende Automatisierung und guten Proben durchsatz. Da in einer Messung alle auszuwertenden Parameter gleichzeitig gemessen werden, eignet sich die Methode besonders gut für Metabolomics-Ansätze, in denen auch subtile Verschiebungen in den Metabolitenverhältnissen von Bedeutung sein können. Dieser Review gibt eine Übersicht über aktuelle Ansätze der NMR-spektroskopischen Messtechnik, Auswertestrategien und praktischen Anwendungen in verschiedenen Studien, sowohl auf der Seite der Lipidanalyse, also auch hinsichtlich des Metabolitenprofils. Die NMR-Spektroskopie hat sich in den letzten Jahren von einer reinen Forschungsmethode mit großen Schritten weiterentwickelt und dürfte in Zukunft einen Platz in der Routinediagnostik einnehmen.

**Schlüsselwörter:** Lipoproteine; Metabolomics; NMR-Spektroskopie; Serum-Analytik

**Abstract:** NMR spectroscopy is a modern analytical method which is extremely suitable for the analysis

of various body fluids. In addition to small metabolite quantification, the method is capable of differentiated lipoprotein subfraction measurements. The technique can be well standardized and allows extensive automation and good sample throughput compared with lipoprotein fractionation via ultracentrifugation. Because all evaluated parameters are determined simultaneously in one measurement, this method is especially suitable for metabolomics approaches in which even subtle changes in metabolite ratios may be relevant. This review gives an overview of the current methods of NMR spectroscopy, analysis strategies, and practical applications in various studies concerning lipid analysis as well as metabolomics. Over the course of the past years, NMR spectroscopy has heavily evolved from a mere research method into a tool that can be expected to play an important role in routine diagnostic testing in the future.

**Keywords:** lipoproteins; metabolomics; NMR spectroscopy; serum analytics.

DOI 10.1515/labmed-2012-0075

Eingang 11.4.2013; Akzeptanz 12.6.2014

## **Methodischer Hintergrund**

### **NMR-Spektroskopie**

Die NMR (Nuclear Magnetic Resonance) Spektroskopie ist eine analytische Messmethode, die es ermöglicht, auf molekularer Ebene Aussagen über die Konzentration, die

**\*Korrespondenz:** Dr. Philipp Pagel, numares GmbH, Josef-Engert-Str. 9, 93053 Regensburg, Germany, Tel.: +49 941 698 091-08, Fax: +49 941 698 091-01, E-Mail: philipp.pagel@numares.com  
**Daniela Baumstark, Johannes Eiglsperger, Volker Pfahlert und Fritz Huber:** numares GmbH, Regensburg, Deutschland

Zusammensetzung und die Struktur von einfachen oder komplexen Molekülen und Mischungen zu treffen, ohne dabei die Probe selbst zu verändern. Dies kann in Flüssigkeiten, aber auch in Festkörpern geschehen. Das Prinzip beruht auf der Wechselwirkung einzelner Kernspins – im einfachsten Fall Protonen bzw. Wasserstoff ( $^1\text{H}$ ) – mit einem starken, von außen angelegten statischen Magnetfeld, in dem sich die Spins entlang des Magnetfelds (in z-Richtung) ausrichten (Abbildung 1).

Mittels geeigneter Radiofrequenzimpulse senkrecht zum statischen Magnetfeld können die Spins, die sich in *Resonanz* mit dem eingestrahlten Impuls befinden, gezielt angeregt und somit ausgelenkt werden. Das führt zu einer Präzession der Spins, die mit der eines Kreisels vergleichbar ist, der durch kurzes Anstoßen in seiner Bewegung gestört wurde. Die Frequenz dieser Präzession in der x-y-Ebene ist die eigentliche Messgröße und hängt von der Stärke des von außen angelegten Magnetfelds ab. Sie wird als *Larmor-Frequenz* bezeichnet.

Die angeregten Kernspins können solange detektiert werden, bis sie wieder in ihren Gleichgewichts-Zustand – parallel zum äußeren Magnetfeld – zurück *relaxieren* (Longitudinale oder  $T_1$ -Relaxation). Tatsächlich fällt das detektierte Signal jedoch noch schneller ab, da verschiedene Kernspins mit unterschiedlichen Resonanzfrequenzen präzessieren. Mit der Zeit verlieren sie somit an Kohärenz, so dass die Spins in unterschiedliche Richtungen zeigen und sich ihr Signal in der Summe gegenseitig aufhebt (Transversale oder  $T_2$ -Relaxation).

Die Resonanzfrequenz eines spezifischen Kernspins wird durch die chemische Umgebung des Kerns beeinflusst: Befindet sich ein Proton beispielsweise in direkter

Nachbarschaft zu einem aromatischen Ring oder einer Carbonsäuregruppe, wird es weniger stark vom Magnetfeld abgeschirmt als ein anderes Proton, das lediglich an einen aliphatischen Rest gebunden ist. Das führt zu sogenannten *chemischen Verschiebungen*, die die Frequenz des Signals relativ zu einem festen Standard beschreibt [1, 2].

## NMR-Methoden

Neben Wasserstoff, der ubiquitär in allen organischen Molekülen vorkommt, kann man unter anderem auch  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  oder  $^{31}\text{P}$  messen und somit zusätzliche wichtige Informationen über andere Kerne erhalten. Außerdem ist es möglich, *mehrdimensionale NMR-Spektren* aufzunehmen, die entweder homonuklear die Kopplung zwischen zwei identischen Kernarten (meist nur  $^1\text{H}$ ) oder heteronuklear die Kopplung zwischen verschiedenen Kernarten (z.B.  $^1\text{H}$  und  $^{13}\text{C}$  oder  $^1\text{H}$  und  $^{15}\text{N}$ ) messen. So kann man zum einen Aussagen über Bindungsmuster und Spinsysteme treffen, zum anderen ist es auch möglich, Abstände zwischen je zwei Kernen über den NOE (Nuclear Overhauser Effect) zu bestimmen und so komplexe Strukturen von Proteinen oder anderen Makromolekülen zu entschlüsseln [1–3].

Die Feinstruktur einzelner Signale im Spektrum gibt Auskunft über die direkten Nachbarkerne, mit denen der beobachtete Kern „koppelt“. Diese sogenannten *J-Kopplungen* führen dazu, dass Signale nicht nur als einfache Lorentz-Linien erscheinen (Singulets), sondern als Dublets, Triplets, Quartetts oder auch Multipletts. Diese

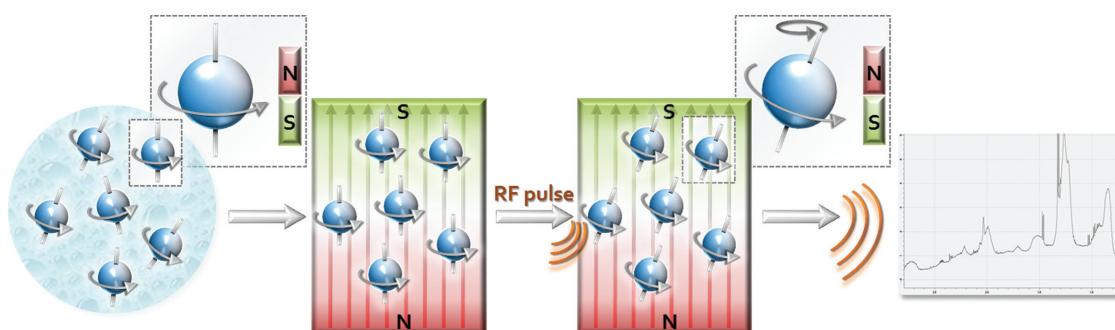


Abbildung 1 Vereinfachte Darstellung der NMR-Methodik.

Die in organischen Molekülen vorkommenden Kernspins verhalten sich ähnlich wie kleine Magnete. Während sie in Lösung statistisch orientiert sind, richten sie sich im äußeren Magnetfeld vorzugsweise parallel aus. In ihrer Summe ergeben sie eine makroskopische Magnetisierung der Spins in z-Richtung. Durch gezielte Anregung der Spins mittels Radiofrequenz rotieren die Spins. Die makroskopische Magnetisierung wird in die Waagerechte gebracht und rotiert ihrerseits nach Abschalten des Pulses im statischen Feld. Dabei bestimmt die unmittelbare Umgebung des Kernspins (z.B. chemische Bindungen, elektrostatische Wechselwirkungen, Lösungsmittelmatrix, etc.) dessen Resonanzfrequenz, welche schließlich im NMR-Spektrum als Signal wiedergegeben wird. Spezifische Moleküle sind daher an ihren charakteristischen Signalmustern eindeutig zu erkennen.

Aufspaltungsmuster führen zu komplexeren Spektren mit zusätzlicher Information, erschweren allerdings auch deren Interpretation. Mit Hilfe eines geeigneten 2D Jres (J-resolved) Pulsprogrammes können diese Kopplungen in eine zweite Dimension überführt werden, so dass man in der ersten Dimension ein stark vereinfachtes Spektrum erhält und in der zweiten Dimension eine genaue Beschreibung der Kopplungsmuster [3, 4].

Relaxationsmessungen werden dazu verwendet, die Zeit zu bestimmen, die ein Kern braucht, um nach dessen Anregung wieder in den Gleichgewichts-Zustand zurückzukehren. Dabei können sowohl die  $T_1$ - als auch die  $T_2$ -Relaxationszeiten nicht nur für gesamte Moleküle, sondern auch für jeden einzelnen Kern, der an ein Molekül gebunden ist, variieren. Hier spielen äußere Effekte wie Viskosität oder Temperatur eine entscheidende Rolle. Relaxationszeiten sind allerdings tendenziell länger für kleinere Moleküle, was auf deren höhere Beweglichkeit und den geringeren Energieaustausch mit ihrer Umgebung zurückzuführen ist. Diesen Umstand kann man sich zunutze machen und über sogenannte *relaxationseditierte Pulsprogramme* gezielt schon bei der Messung über spezifische Relaxationszeiten filtern [3, 5].

Ein ähnliches Verfahren ist auch mit *diffusionsseditierten Pulsprogrammen* möglich. Diffusionsmessungen zielen darauf ab, unterschiedliche Substanzen nicht – wie vorhin beschrieben – nach ihren Relaxationszeiten zu filtern, sondern nach ihrem Diffusionsverhalten. Die Diffusion hängt stark mit der Beweglichkeit und der Größe des entsprechenden Moleküls oder Makromoleküls zusammen. Je schneller sich ein Molekül bewegt, desto mehr Signalverlust erhält man in diffusionsgewichteten Spektren. Misst man mehrere unterschiedlich gewichtete Diffusionsspektren hintereinander, ist es sogar möglich den absoluten Diffusionskoeffizienten eines Moleküls in der Lösung zu bestimmen und somit Rückschlüsse auf dessen Größe bzw. Radius zu ziehen. Auch hier kann man speziell editierte Pulsprogramme verwenden, die nur die langsam diffundierenden Partikel heraus filtern, oder über die Differenz zum ursprünglichen Spektrum entsprechend die hoch beweglichen Moleküle abbilden [6–8].

Bislang war die NMR-Spektroskopie Experten vorbehalten, die die komplexen Geräte beherrschen, was einen Routineeinsatz in der Diagnostik weitgehend unmöglich machte. Aktuelle Angebote kommerzieller Anbieter haben diese Hürde durch umfassende *Automatisierung und Standardisierung* jedoch inzwischen weitestgehend beseitigt, sowohl auf der Seite der Probenvorbereitung als auch bei der eigentlichen Messung. Geräte, wie sie üblicherweise in der Forschung zum Einsatz kommen, können zwar auch die technischen Anforderungen erfüllen, stoßen jedoch

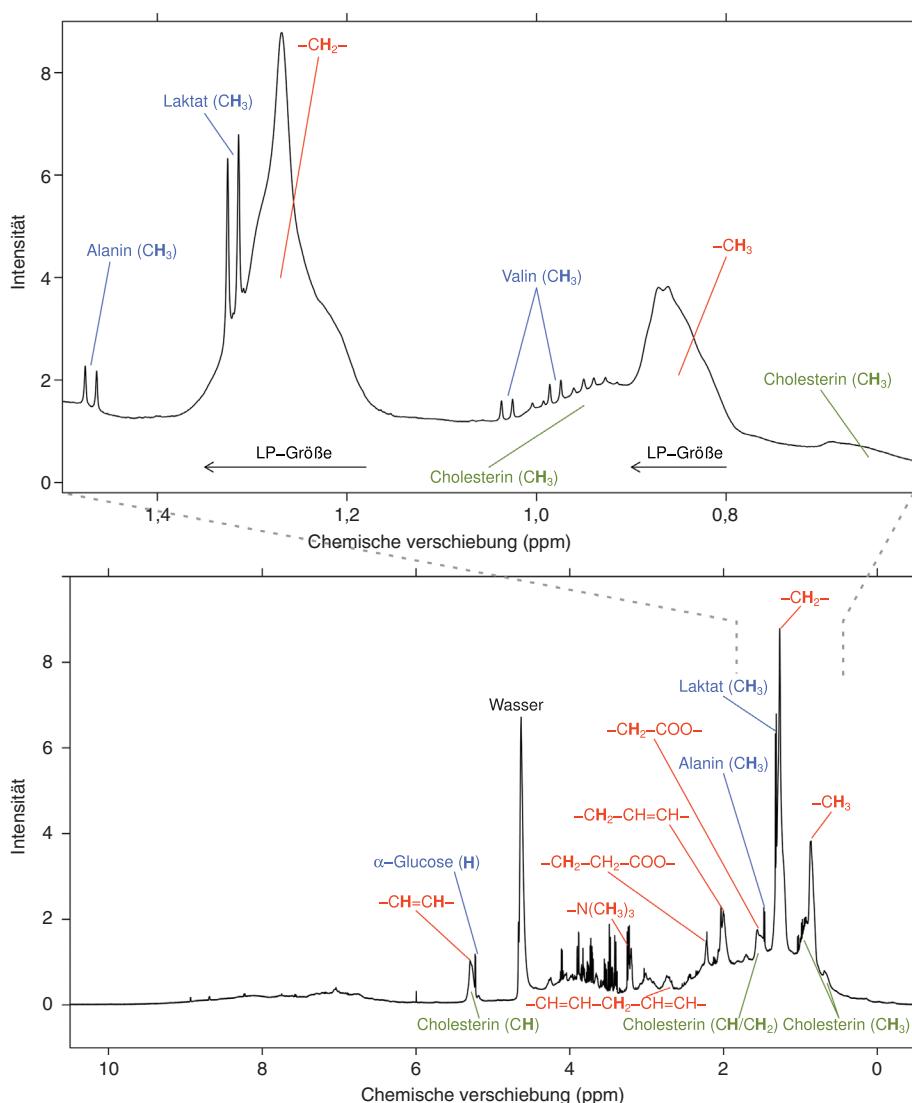
hinsichtlich der Prozesskontrolle und Softwarestandardisierung häufig an ihre Grenzen. Der Vorteil kommerzieller Systeme zeigt sich auch in punkto Probendurchsatz, so ist es mittlerweile möglich mehrere hundert Proben pro Gerät und Tag zu messen. Als aufstrebende Technologie bietet die NMR-Spektroskopie somit flexible und anspruchsvolle Analysemöglichkeiten, die schon bald Eingang in die klinischen Labore finden könnten.

## NMR-Analytik von humanem Serum

Da im Grunde jede organische Substanz Wasserstoffatome enthält, ist die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie hervorragend geeignet, in einer einzelnen Messung eine große Anzahl unterschiedlichster Substanzen gleichzeitig zu erfassen. Ein großer Vorteil besteht darin, dass man die gesamte *Information in einem einzigen Spektrum* erhält. Dadurch entfallen Ungenauigkeiten aus unterschiedlichen präanalytischen Schritten, wie sie bei vielen anderen Methoden erforderlich sind. NMR-Spektren erlauben daher eine hervorragende Vergleichbarkeit innerhalb einer Messung, so dass auch subtile Veränderungen von Metaboliten zueinander detektierbar werden. War die Quantifizierung der Komponenten eines Spektrums früher zeitraubende Handarbeit, für die NMR-Experten erforderlich waren, erlauben heute aktuelle Softwaremethoden bei guter Standardisierung die vollautomatische Erkennung und Quantifizierung vieler Signale im Spektrum. Solche Systeme werden in Kürze auch als kommerzielle Produkte zur Verfügung stehen.

Prinzipiell eignet sich jede Art von flüssiger Probe zur NMR-Analyse: Urin, Blut, Liquor cerebrospinalis, Punktatflüssigkeit, etc. In der Praxis spielen vor allem Serum und Urin eine wichtige Rolle. Grundsätzlich wäre auch die NMR-spektroskopische Analyse von Vollblut möglich. Die zusätzliche Information durch die Signale der zellulären Bestandteile und Gerinnungsfaktoren sind jedoch meist unerwünscht. Material der Wahl ist daher Serum, aber auch Plasma kann ggf. analysiert werden, solange die NMR-Signale der enthaltenen Gerinnungshemmer (z.B. Heparin, EDTA, Citrat etc.) nicht die zu analysierenden Signale überlagern.

Ein typisches NMR-Spektrum von humanem Serum ist in Abbildung 2 dargestellt. Zwischen 6 und 0 ppm sind einige bestimmende Signale zu erkennen. Zusätzlich kann man oberhalb von 6 ppm, aber auch über den restlichen Frequenzbereich verteilt, breite unstrukturierte Hintergrundsignale sehen, die im Wesentlichen von *Proteinen* hervorgerufen werden. Die sehr schmalen Linien sind auf



**Abbildung 2** NMR-Spektrum (Messung bei 600 MHz) von humanem Serum mit schematischer Beschriftung der Signale. (orange) Atomanordnungen in Lipiden, (grün) Atomanordnungen in Cholesterin, (blau) charakteristische Metaboliten-Signale.

kleine Metabolite wie Aminosäuren oder Zucker zurückzuführen, die eine hohe Beweglichkeit in der Lösung besitzen. Die dominanten breiteren Signale stammen von Lipoproteinen, den Transportvehikeln der Lipide [9]. In wässrigen Proben wird das Lösungsmittelsignal generell über ein geeignetes Pulsprogramm unterdrückt, da es sonst das gesamte Spektrum dominieren würde. Das in Abbildung 2 dargestellte Signal bei etwa 4,5 ppm stellt nur noch das Restwassersignal dar, das während der Messung nicht vollständig unterdrückt wurde.

Prinzipiell werden in NMR-Spektren weniger die gesamten Moleküle betrachtet, sondern vielmehr einzelne markante Molekülgruppen wie Methyl- ( $-\text{CH}_3$ ), Methylen- ( $-\text{CH}_2-$ ) oder Cholingroupen ( $-\text{N}(\text{CH}_3)_3$ ), da ein gesamtes Molekül aus vielen Einzelsignalen besteht. Ist die Molekülstruktur bekannt, lässt sich über die Anzahl

der entsprechenden Protonen eine quantitative Aussage treffen.

## Analyse von Metaboliten

Neben Proteinen und Lipoproteinen, die als globuläre Aggregate vorliegen, befinden sich in Serum hauptsächlich kleine Moleküle, die sich mehr oder weniger uneingeschränkt bewegen können. Während Salze der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie aufgrund mangelnden Wasserstoffs nicht zugänglich sind, kann man monomere Bausteine wie Zucker oder Aminosäuren eindeutig zuordnen. Sie liefern sehr schmale Signale und können daher leicht quantifiziert werden.

Mittlerweile lassen sich beinahe alle Signale im Serum-Spektrum eines Spenders identifizieren. Über

verschiedene ein- und zwei-dimensionale, sowie relaxations- oder diffusionseditierte Pulsprogramme wurden sowohl kleine Metabolite als auch Lipoprotein- und Proteinsignale zugeordnet [5, 9]. Es konnten auch über die Unterdrückung kleiner Metabolite während der Messung erstmalig Spektren von Lipoproteinen generiert werden, die nicht vorher erst aus Serum isoliert werden mussten. Vielmehr konnten sogar beliebige Spektren basierend auf der unterschiedlichen Beweglichkeit der Moleküle über geeignete Kombination aus relaxations- und diffusionseditierter NMR-Spektroskopie erstellt werden [7]. Die Diffusionskoeffizienten einiger Metabolite wurden außerdem mit Hilfe von zweidimensionaler homonuklearer TOCSY (Total Correlated Spectroscopy) gleichzeitig in einer einzigen Serumprobe bestimmt [10].

Die NMR-Spektroskopie liefert zahlreiche Mittel zur gezielten Selektion der gewünschten Information und auch zur Strukturaufklärung, doch will man die tatsächliche Konzentration einer Substanz absolut bestimmen, greift man im besten Fall auf die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie zurück, die nicht nur im Vergleich zu anderen Methoden deutlich schneller ist, sondern auch ohne weiteres Zutun oder mit Hilfe von einfachen Korrekturberechnungen quantitative Ergebnisse liefert [11].

Zur quantitativen Analyse von kleinen Metaboliten ist es von Vorteil, den Untergrund zu beseitigen, der durch die Makromoleküle hervorgerufen wird. Es konnte gezeigt werden, dass diffusionseditierte Pulsprogramme nahezu identische NMR-Spektren der hochmolekularen Bestandteile lieferten wie normale  $^1\text{H}$ -Spektren von ultrafiltrierten Serumproben aus dem Labor [8]. Über Differenzbildung zum NMR-Spektrum von gesamtem Serum konnten somit einzig die kleinen Moleküle dargestellt und effizient quantifiziert werden.

## Differenzierte Analyse von Lipoproteinen

Die Analyse von Lipoproteinen (LP) ist alles andere als trivial, da sich ein einziges Partikel aus Hunderten von Lipiden und einigen wenigen Proteinen, den Apolipoproteinen, zusammensetzt. Diese Partikel weisen eine zusätzliche Diversität auf, da die einzelnen LP-Klassen (CM, VLDL, LDL und HDL) nicht homogen sind, sondern auch Unterschiede in Zusammensetzung und Größe zeigen [12]. Im Serum befindet sich somit eine komplexe Verteilung von heterogenen LP-Klassen, die außerdem durch diverse Serumproteine und Metabolite überlagert werden. Die Zusammensetzung der LP und Lipide in Serum spiegelt sich schließlich in der Kurvenform der NMR-Spektren wieder.

Aufgrund der chemischen Verschiebung von unterschiedlich großen Partikeln ist eine differenzierte Quantifizierung zahlreicher LP-Subklassen möglich. Es wurde gezeigt, dass sich das Verhältnis von Partikelinnerem (in dem die Lipide unstrukturiert verteilt sind) zur Partikelmembran (in dem die Lipide radial geordnet vorliegen) in einer allgemeinen Richtungsabhängigkeit der Magnetisierbarkeit äußert, also parallel zum Magnetfeld oder senkrecht zum Magnetfeld. Für größere Partikel ergibt sich daraus eine geringere Abschirmung und folglich eine höhere chemische Verschiebung als für kleinere Partikel [13].

Dieser Größenshift ist ausreichend groß, um eine Differenzierung zu erhalten und wurde erstmals Anfang der 1990er Jahre zur Quantifizierung von LP in Serum genutzt [14–17]. Dazu wurden NMR-Spektren von isolierten LP (VLDL, LDL und HDL) aufgenommen und als Basis für einen Fit-Algorithmus verwendet, mit dem die Methylregion von Serumspktren durch Linearkombination der Basisspektren rekonstruiert wurde. Anhand der Intensität der gefitteten Basisspektren konnte auf die LP-Verteilung rückgeschlossen und zudem eine hohe Korrelation ( $r>0,8$ ) zu den klassisch bestimmten Lipidkonzentrationen gefunden werden, die in den jeweiligen LP in besonders hohem Maße vorkamen. Somit war es nicht nur möglich die LP selbst zu quantifizieren, sondern auch die darin befindlichen Lipide.

Dieser Ansatz wurde mit Hilfe neuronaler Netze noch weiter vorangetrieben. Im Gegensatz zu Fitmethoden liefert diese Variante ein mathematisch unabhängiges Modell, das nicht auf Spektren isolierter LP beruht [18, 19]. Dazu wurden Serumspktren aufgenommen und über enzymatische Methoden die dazugehörigen Lipidkonzentrationen der einzelnen isolierten LP bestimmt. In einem Trainingsset wurde der Methyl- und Methylenbereich der NMR-Spektren mit den entsprechenden Lipidkonzentrationen in Relation gesetzt und die erlernte Vernetzung anschließend an einem unbekannten Testset überprüft. Die Korrelation zu den biochemischen Daten war sehr gut ( $r=0,70$ – $0,99$ ), so dass alle LP-Hauptkomponenten mit hoher Genauigkeit und in sehr kurzer Zeit bestimmt werden konnten.

Ein Vergleich dieser neuronalen Netze mit multivariaten Analysemethoden, insbesondere PLS-Modellen (Partial Least Squares), bestätigten die guten Korrelationen nicht nur für verschiedene Lipidkonzentrationen ( $r=0,73$ – $0,99$ ), sondern auch erstmalig für die Proteinkomponenten ApoAI ( $r=0,92$ ) und ApoB ( $r=0,97$ ) [20]. Ähnlich gute Werte lieferten statistische Algorithmen wie MCMC-Verfahren (Markov Chain Monte Carlo) [21].

Weiterhin ist es möglich, die Partikelgröße anhand der Diffusion im NMR zu erfassen. Dies geschieht in

sogenannten diffusionsgewichteten Spektren (Diffusion Ordered Spectroscopy, DOSY), in denen sich letztlich die Diffusionskoeffizienten von LP bestimmen lassen. Auch direkte Rückschlüsse auf die Partikel-Radien sind hierbei möglich und wurden 2012 in einer Studie an isolierten LP bestimmt [22]. Die Korrelation zu Partikelgrößen, die mittels Elektronenmikroskopie bestimmt wurden, war sehr gut ( $r=0,9$ ).

Eine quantitative Bestimmung der LP-Klassen durch deren nur leicht unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten ist schwierig und kann über ein einfaches DOSY-Spektrum von Serum aufgrund der komplexen Überlagerung der LP nicht bewerkstelligt werden [23]. Über die Kombination mit mehrdimensionalen chemometrischen Zerlegungsmethoden lässt sich jedoch auch diese Methode zur Quantifizierung von LP und diversen LP-Subklassen verwenden [24].

Die verschiedenen Analysemöglichkeiten sind mit mehr oder weniger Arbeits- und Zeitaufwand verknüpft. Letztendlich kann man aber schon anhand einfacher  $^1\text{H}$ -Spektroskopie in wenigen Minuten eine ansehnliche Fülle an Informationen über die Zusammensetzung und die Konzentration unterschiedlichster Metabolite erhalten, besonders in Kombination mit mathematischen Auswerteverfahren. Die Ergebnisse korrelieren meist sehr gut mit herkömmlichen Methoden, sind aber weniger zeitaufwändig, können automatisiert werden und bergen daher auch weniger Fehlerquellen.

## Die NMR im Vergleich zu anderen Methoden

Der aktuelle Goldstandard zur LP-Analyse ist die Ultrazentrifugation (UZ), in der die LP nach ihrer Dichte aufgetrennt werden. Dies kann entweder in diskreten Schritten oder über einen kontinuierlichen Dichtegradienten erfolgen [25, 26]. Die Separation mittels UZ ist zeitaufwändig und erfordert einen hohen manuellen Einsatz. Zudem werden bei dieser Methode oft hohe Salzkonzentrationen verwendet und es wirken starke äußere Kräfte auf die Proben. Dennoch ist es die einzige Methode, mit der man in präparativem Maßstab die einzelnen LP-Komponenten selektiv aus Serum isolieren kann. Außerdem ist es möglich, über Dichtegradienten eine weitere Subfraktionierung der LP (z.B. LDL oder HDL) zu erhalten [27, 28].

Die Größenausschluss-Chromatographie (SEC, Size exclusion chromatography), die Partikel nach ihrer Größe trennt, wurde als alternative Methode diskutiert, da sie ein deutlich milderes Verfahren darstellt, bei dem zudem

in physiologischem Puffer gearbeitet werden kann. Leider ist die Trennleistung von gesamtem Serum nicht mit der UZ vergleichbar, die Probenmengen sind deutlich kleiner und es findet zusätzlich eine massive Verdünnung der Proben statt [29, 30]. Eine Subfraktionierung einzelner LP-Fraktionen ist prinzipiell möglich, erfordert aber auch die vorherige Isolierung mittels UZ und eine anschließende Konzentrierung der Fraktionen [31, 32]. Ein weiterer Vorteil der SEC ist jedoch die direkt gekoppelte Analyse, z.B. über UV-Absorption. Eine quantitative Messung einzelner Lipidbestandteile ist auf diese Weise jedoch nicht möglich.

Die Elektrophorese trennt die LP nach Größe und Ladung. Die Proben können entweder mit einem Protein- oder Lipidfarbstoff gefärbt werden und so auch quantitativ ausgewertet werden [33]. Diese Methode hat allerdings kaum präparativen Charakter, da die Probenmengen extrem klein sind und außerdem ein zusätzlicher Reinigungsschritt erfolgen muss, der die LP wieder aus der Gelmatrix isoliert.

Die klassische Analyse zur Lipidquantifizierung beruht üblicherweise auf einer Kaskade enzymatischer Reaktionen und einer anschließenden quantitativen Bestimmung der Absorption eines farbigen Endproduktes. So werden z.B. Cholesterin, Cholesterinester oder Triglyceride in der Regel vollenzymatisch bestimmt – gegebenenfalls nach vorheriger Hydrolyse [33]. Diese Methode ist einfach und billig, eine vorherige Isolierung des Probenmaterials ist allerdings notwendig. Außerdem kann man mit dieser Methode nur bedingt Aussagen über die Zusammensetzung einzelner Partikel treffen und bekommt keine Informationen über die Anzahl oder Größe der Partikel, da immer nur die mittlere Konzentration der gesamten Probe gemessen wird.

Als Analysemethode hat sich zunehmend auch die Massenspektrometrie bewährt. Hierbei werden die Massen von Molekülfragmenten der Einzelbestandteile gemessen und können quantifiziert werden [34, 35]. Man bekommt also eine Aussage über die Zusammensetzung der Probe. Wie bei der enzymatischen Methode ist auch hier eine vorherige Separation notwendig. Die Methode ist zudem teuer und erfordert Expertenwissen.

Die NMR-Spektroskopie liefert als einzige Analyse-Methode eine Aussage über die Größe und Zusammensetzung einer Serumprobe, ohne diese vorher fraktionieren zu müssen. Die Probe kann außerdem in ihrer physiologischen Umgebung gemessen werden und man bekommt in einer einzigen schnellen Messung Informationen über die Größenverteilung und Zusammensetzung von Lipoproteinen, über die verschiedenen Proteinbestandteile und kleinen Metaboliten. Man benötigt mehr Material als bei den üblichen Methoden (mind. 300  $\mu\text{L}$ ), die Probe kann aber unverändert weiter benutzt werden. Auch hier war bisher das Knowhow von Spezialisten gefragt und

die Geräte erfordern zunächst deutliche Investitionen. Aktuell kommerzielle Angebote erlauben jedoch zunehmend den kostengünstigen Einsatz der Methode.

In Tabelle 1 ist eine Übersicht über die Vor- und Nachteile der Methoden dargestellt.

## Klinische Anwendung in Studien

### Lipoproteine

Die Verteilung der LP-Klassen und Subklassen im Blut steht seit langem im Fokus der Forschung und wird mit vielen Krankheitsbildern in Verbindung gebracht. Da sich mit unterschiedlicher Zusammensetzung die Kurvenformen in NMR-Spektren signifikant ändern, ist eine akkurate Analyse vielversprechend.

Bereits Ende der 80er Jahre wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen bösartigen Tumorerkrankungen und der Liniendichte von Methyl- und Methylenignalen in <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von Serum kontrovers diskutiert [36, 37]. Wie sich zeigte, war tatsächlich ein erhöhter TG- und damit auch VLDL-Spiegel und eine entsprechend geringere HDL-Konzentration – wie sie in gesunden Patienten zu finden ist – der Grund für die schmäleren Linien [38–40]. Der Einsatz multivariater Fitmethoden an NMR-Spektren ermöglichte hier eine detaillierte Aussage über

die relativen Konzentrationen der Lipoproteine (VLDL, LDL und HDL) zueinander [41].

Die Verwendung ebensolcher Fitmethoden zeigt den immensen Vorteil der NMR gegenüber alternativen Analysemethoden. Während standardmäßig die Konzentration der Lipide (Cholesterin oder TG) in Serum oder vorab isolierten LP gemessen wird, liefert die NMR Informationen über Anzahl und Größe der jeweiligen Partikel ohne einen vorherigen Separationsschritt. 2002 wurde diese Eigenschaft im Rahmen der Framingham Offspring Study an 3437 Probanden herausgestellt [42]. An einem Subset der Teilnehmer wurde gezeigt, dass kein direkter Zusammenhang zwischen der Konzentration der LDL-Partikel und des darin enthaltenen Cholesterins gefunden werden konnte, da die Lipidzusammensetzung in LDL extrem variiert. Mit klassischen Bestimmungsmethoden könnte dieser Umstand nicht berücksichtigt werden. Eine hohe Konzentration an LDL-Cholesterin könnte entweder bedeuten, dass viele Partikel mit jeweils geringem Cholesteringehalt oder wenige Partikel mit hohem Cholesteringehalt vorliegen. Erstere Gruppe würde von einer LDL-senkenden Therapie profitieren, eine Erkennung sei durch eine konventionelle Analyse jedoch nicht möglich [42].

Die unterschiedlichen Größen von VLDL und LDL wurden ebenso über NMR-Spektroskopie untersucht. In einer Studie an 918 Kindern im Alter von 10 bis 17 Jahren wurde gezeigt, dass Jungen im Vergleich zu Mädchen durchschnittlich um 0,1 nm kleinere LDL- und um 0,7 nm

**Tabelle 1** Übersicht über die wichtigsten Separations- und Analysemethoden von Lipoproteinen.

Separations-/Analysemethode	Typ	Separations-/Analysegröße	Vorteile	Nachteile
Ultrazentrifugation (UZ)	Separation	Dichte	Präparative gute Trennung im großen Maßstab	Sehr aufwändig, hohe Einwirkung von Kräften, hohe Salzkonzentrationen
Größenausschluss-chromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC)	Separation, Analyse	Partikelgröße	Schonende Separation in physiologischem Puffer, gekoppelte Analyse	Schlechte Trenneigenschaften, Verdünnung der Proben
Elektrophorese (EP)	Separation, Analyse	Partikelgröße und Ladung	Präparative Trennung im kleinen Maßstab möglich, quantitativ mittels Färbung	Aufwändig, begrenzte Aussagekraft
Klassische Diagnostik (Enzymatische Farbreaktion)	Analyse	Lipidkonzentration	Einfach, billig, quantitativ	Begrenzte Aussagekraft, vorherige Separation notwendig
Massen-Spektrometrie (MS)	Analyse	Zusammensetzung	Geringes Probenmaterial, quantitativ	Begrenzte Aussagekraft, vorherige Separation notwendig, teuer, Expertenwissen notwendig
Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	Analyse	Partikelgröße und Zusammensetzung	Schnell, keine vorherige Separation notwendig, Probe wird nicht verbraucht, quantitativ, standardisierbar, automatisierbar	Größere Probenmengen, Expertenwissen notwendig, bisher teuer, hat aber das Potential zu vernünftigen Kosten in die Routine zu gehen

größere VLDL-Partikel aufwiesen. Außerdem wurde eine positive Abhängigkeit der VLDL-Größe vom Alter weißer Kinder gefunden, allerdings nicht bei anderen Ethnizitäten [43]. Schwarze Kinder hatten im Allgemeinen größere LDL und kleinere VLDL, was auf unterschiedliche Lipidverhältnisse zurückzuführen war. Die entsprechenden HDL-Subklassen wurden in einer Folgestudie untersucht [44]. Hier wurden abnehmende durchschnittliche Partikelgrößen mit steigendem Alter von Jungen gemessen und im Allgemeinen größere HDL-Partikel bei Mädchen (im Vergleich zu Jungs) und bei schwarzen Kindern (im Vergleich zu weißen). Wurden allerdings die HDL-Subklassen betrachtet und nicht Gesamt-HDL, wurden teils entgegengesetzte Beobachtungen gemacht. Die Konzentration der größeren HDL-Partikel sank mit dem Alter, während die Konzentration von kleineren HDL-Partikeln mehr oder weniger konstant blieb. Zudem konnten Korrelationen zum Gewicht der Kinder, TG-Gehalt und LDL-Cholesterin gefunden werden. Weitere Erkenntnisse wurden im Vergleich des Körpergewichts der Kinder mit deren TG-Werten und verschiedenen VLDL-Subklassen erhalten [45]. Der durchschnittliche TG-Gehalt war in weißen Kindern tendenziell höher als in schwarzen, außerdem war das Verhältnis von Tailenumfang zu TG-Konzentration bzw. großen VLDL in weißen Kindern 2–6 mal so hoch wie in schwarzen Kindern.

Änderungen in LP-Profilen erhält man insbesondere bei extremen Belastungen oder Stresssituationen. Bei Triathleten hatte z.B. ein Wettkampf bei 28 Probanden einen günstigen Einfluss auf die Verteilung der LP-Klassen in ihrem Blut [46]. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie wurde sowohl eine sehr deutliche Senkung kleiner LDL erkannt, als auch ein leichter Anstieg der großen LDL- und eine leichte Senkung der kleinen HDL-Partikel.

Ein positiver Lebensstil hat generell einen positiven Effekt auf die LP-Verteilung im Blut. 2009 wurden in einer Studie 73 Probanden dazu aufgefordert, sich über mehrere Wochen nach einer strikten vegetarischen fettarmen Diät zu ernähren und sich regelmäßig zu bewegen, was sich günstig auf ihre LDL-Werte auswirkte, wie mittels NMR-Spektroskopie bestätigt wurde [47]. Aber schon allein die Ernährungsumstellung auf eine cholesterin- und fettarme Diät bei konstant gehaltenem Körpergewicht zeigte ein günstigeres LP-Profil – bei Männern sogar noch deutlicher als bei postmenopausalen Frauen [48]. In einer anderen Untersuchung wurde nur der Einfluss von körperlicher Betätigung ohne Ernährungsumstellung betrachtet [49]. Dazu sollten die Studienteilnehmer regelmäßig Sport treiben – in drei verschiedenen Gruppen unterschiedlich intensiv – aber dabei ihr Körpergewicht halten.

Die NMR-spektroskopische LP-Bestimmung zeigte, dass nicht die Intensität ausschlaggebend für das verbesserte Blutbild war, sondern die Menge an Bewegung.

Von besonderem medizinischem Interesse ist heute eine frühzeitige Erkennung und akkurate Risikoeinschätzung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Ein Bezug zur Verteilung der LP bzw. der darin befindlichen Lipide im Blut ist mittlerweile umstritten. Die Messung von Lipid-Konzentrationen, wie sie im klinischen Routinebetrieb durchgeführt wird, liefert jedoch keine ausreichenden Aussagen über die Anzahl und Größe der LP-Partikel. Lediglich die ApoB-Konzentration sollte mit der Partikelkonzentration von LDL korrelieren, gibt aber auch keine Auskunft über deren Größe. Zudem deuten neueste Erkenntnisse darauf hin, dass es auch Abweichungen zu der bekannten Korrelation von ApoB und der Anzahl der LDL-Partikel gibt [50]. In zahlreichen NMR-Studien wurden daher Zusammenhänge des LP-Profils in gesunden und Risiko-Patienten durchgeführt. Für den Schweregrad einer Koronaren Herzkrankheit (KHK) fand man eine positive Korrelation mit großen VLDL- und kleinen HDL-Partikeln, sowie eine negative Korrelation mit durchschnittlich großen HDL-Partikeln, unabhängig vom Alter der Probanden [51]. Für LDL ergab sich in einer späteren Studie an älteren Frauen ein Zusammenhang des Krankheitsbildes mit besonders kleinen LDL und erhöhter Partikelkonzentration [52], wobei die Konzentration eine bessere Vorhersagekraft lieferte, sowohl für KHK [53] insbesondere aber auch für das Metabolische Syndrom [54]. Auch Geschlechtsunterschiede bei KHK wurden untersucht und bestätigten bereits bekannte Erkenntnisse [55]. Wenngleich auch die NMR-Spektroskopie als Risiko-Vorhersagemodell noch nicht das Niveau etablierter klinischer Diagnostik erreicht, birgt sie dennoch erhebliches Potential und dürfte sich als gute Ergänzung des klassischen Spektrums klinischer Diagnostik etablieren [56].

Neuere Untersuchungen an Makrophagen, die nach exzessiver Aufnahme von modifiziertem LDL maßgeblich an der Bildung von Arteriosklerose beteiligt sind, liefern interessante neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet [57]. Dazu wurden Monozyten von Patienten isoliert und zu Makrophagen differenziert. Durch die Zugabe von ApoAI und HDL2 wurde das Ausströmen von Cholesterin initiiert und quantitativ bestimmt. Parallel dazu wurde das LP-Profil der Patienten mittels NMR bestimmt. Eine hohe Konzentration kleiner HDL und LDL bzw. eine niedrige Konzentration großer LP (VLDL und CM) korrelierte mit einem erhöhten Ausströmen von Cholesterin aus den Makrophagen. Im Gegensatz dazu wurde keine Abhängigkeit zu den jeweiligen Cholesterinwerten gefunden.

Probanden mit signifikanter Stenose wiesen niedrigeren Ausfluss von Cholesterin auf.

Viele weitere Einflüsse wie Type-1-Diabetes [58–60], Enzymaktivität [61] oder Hormonkonzentration [62] wirken maßgeblich auf das LP-Profil ein und wurden in zahlreichen NMR-Studien untersucht.

Die Identifizierung der Genloci, die für die Ausprägung des LP-Subklassen-Profils bei KHK-Patienten verantwortlich sind, wurde 2007 erstmals untersucht [63]. Die Erblichkeit des Subklassenspektrums wurde mittels univariaten und multivariaten Berechnungen ermittelt und reichte für HDL und LDL von ca. 20% bis 50%. Zudem wurde über Kopplungsanalysen die Ausprägung der HDL-Konzentration auf das Chromosom 18 lokalisiert (LOD 3,3) und die der HDL-Partikelgröße auf das Chromosom 12 (LOD 2,9 bzw. 3,7 nach multivariater Anpassung). Die jeweiligen Konzentrationen und Partikelzahlen wurden über NMR-Spektroskopie ermittelt. Detailliertere Phänotypisierung für HDL führte außerdem zu interessanten Zusammenhängen von HDL-Größe und Stoffwechsel-Enzymen wie LIPC (hepatic triglyceride lipase), PLTP (Phospholipid transfer protein) oder FBLN5 (Fibulin-5) [64]. Über HDL-Größen, die mittels NMR-Spektroskopie erhalten wurden, wurde eine bessere Phänotypisierung erreicht als über HDL-Cholesterin-Konzentrationen. In einer erweiterten Studie mit fast 2000 Proben, deren LP-Subklassen im Detail analysiert wurden, wurden mittels Cluster-Analysen und Assoziationen zu bekannten Subfraktionen 8 Genloci identifiziert, die mit LP-Subklassen in Zusammenhang stehen und 4 Loci, die auf Serum-Lipide zurückzuführen sind [65].

## Metabolomics

Unter Metabolomics versteht man die gleichzeitige Erfassung einer großen Anzahl von Metaboliten im Sinne eines metabolischen Zustandsbildes. Der Ansatz ist die logische Fortführung der Omics-basierten Forschung, die sich ausgehend von Genomics und Transkriptomics über Proteomics zu Metabolomics immer weiter dem (patho-)physiologischen Geschehen annäherte.

Dabei geht es in der Regel nicht nur wie in klassischen Biomarker-Ansätzen darum, einzelne Moleküle zu identifizieren, die als diagnostische Parameter geeignet erscheinen. Vielmehr geht der Ansatz davon aus, dass sich unterschiedliche Funktionszustände des Organismus in unterschiedlichen metabolischen Mustern widerspiegeln. So verändern Faktoren wie Ernährung, Aktivität und nicht zuletzt Erkrankungen die Steady-States unterschiedlicher Stoffwechselwege. Diese zu messen und die relevante

Information aus den Daten zu filtern ist die Herausforderung, die es in der Entwicklung der Metabolomics-Diagnostik zu meistern gilt [66].

Wie oben dargelegt, eignet sich die NMR-Spektroskopie hervorragend zur reproduzierbaren Erfassung metabolischer Parameter und stellt somit eine wichtige technologische Säule in diesem Feld dar. Entsprechend wurde die Methode bereits in zahlreichen Studien mit unterschiedlichen Fragestellungen verwendet, von denen wir im Folgenden einige herausstellen.

2011 wurde an einigen Freiwilligen der Einfluss ausgedehnten Fastens auf einen Zeitraum von bis zu 36 Stunden untersucht [67]. NMR-Spektren von Blut und Urin lieferten dabei neben anderen Analysen wertvolle Informationen über fastenbedingte Änderungen der Metabolite. Insgesamt wurden in dieser Studie neben den bekannten Markern wie Fettsäuren, Glycerin und Ketokörpern einige neue Biomarker identifiziert. Dazu gehörten  $\alpha$ -Aminobutyrat und andere Amino- und Ketosäuren. Erst kürzlich wurde dieser Ansatz in erweiterter Form untersucht [68]. 15 junge, gesunde männliche Freiwillige unterzogen sich einem genau kontrollierten Programm, bestehend aus 36 Stunden Fasten, spezieller Flüssignahrung, Sport, Kälte und zahlreichen Tests (Glukosetoleranztest, Lipidtest, Haarproben, Blut-, Urin- und Atemluftuntersuchungen). Mittels Massenspektroskopie und NMR-Analysen wurden unter 275 Metaboliten – insbesondere Lipide und Aminosäuren – die Metabolite identifiziert, die eine hohe positive Korrelation in ihrem zeitlichen Verlauf zeigten, so z.B. die vorhandene Menge an Chylomikronen und VLDL ( $r=0,9$ , NMR), aber auch solche, die eine starke negative Korrelation aufwiesen, wie Carnitin und Acylcarnitin ( $r=-0,66$ , MS) als beste Indikatoren für katabolische und anabolische Bedingungen.

Der Einfluss spezieller Nahrung auf das Stoffwechselmuster wurde auch in einer Studie zur Gewichtsreduktion untersucht [69]. Dazu wurden 3 Versuchsgruppen aus jeweils 31 Frauen über 24 Wochen entweder  $\omega$ -3-Fischöl verabreicht oder ein Placebo. Zusätzlich absolvierten zwei der drei Gruppen über 12 Wochen ein Gewichtsreduktionsprogramm. Bei Probanden, die Fischöl und keine Placebos bekamen, wurde unabhängig vom Gewichtsverlust eine spezifische Änderung im Lipid-Profil diagnostiziert, die durch eine Erhöhung von PL und eine Reduktion bestimmter TG erklärt wurde.

Die NMR-spektroskopische Analyse des LP-Profils kombiniert mit kleinen Metaboliten wurde insbesondere auch zur verbesserten Risikobewertung von Krankheiten verwendet [70]. An 1595 Studienteilnehmern zwischen 24 und 39 Jahren wurde im Rahmen der Cardiovascular Risk in Young Finns Study zu Beginn und nach einem Zeitraum

von sechs Jahren die Interna-Media-Dicke bestimmt und mit den entsprechenden Blutwerten korreliert. Die besten Vorhersagen konnten anhand der Konzentration von LDL-Cholesterin, durchschnittlich großem HDL und verschiedenen Metaboliten wie Tyrosin und Glutamin – alles mit NMR bestimmt – getroffen werden.

Ähnliche Modelle wurden auch zur Früherkennung von Diabetes und deren typischen Folgekrankheiten diskutiert. In einer Studie an 182 Typ-1-Diabetikern und 21 gesunden Probanden konnte eine klare Unterscheidung zwischen den beiden Gruppen getroffen werden, die einzig auf einem abweichenden Muster der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren basierte. Außerdem wurde die Vorhersagegenauigkeit für Nephropathie untersucht und mit biochemischen Werten verglichen. Die Sensitivität der NMR-Daten war mit 87,1% (Referenz: 83,9%) etwas besser als die Referenzwerte, die Spezifität war mit 87,7% (Referenz: 95,9%) etwas schlechter [71]. Eine weitere Untersuchung basierte auf 613 Teilnehmern mit Typ-1-Diabetes, die ein breites Spektrum an Komplikationen wie Nephropathie, Insulinresistenz und Metabolisches Syndrom aufwiesen. Diese lieferte ebenfalls vielversprechende Ergebnisse [72].

In einer Hypertonie-Studie wurden NMR-spektroskopische Serum-Analysen herangezogen, um typische Veränderungen in Gruppen unterschiedlicher Schweregrade zu untersuchen [73]. Über chemometrische Methoden in Kombination mit  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren konnten 28 Probanden mit normalem Blutdruck effektiv von solchen mit leicht (19 Probanden) oder stark erhöhtem Blutdruck (17 Probanden) separiert werden.

Metabolomics auf Basis der NMR-Spektroskopie wurde insbesondere in der Krebsforschung erfolgreich untersucht. So konnten in einer Studie aus 36 Leberzirrhose-Patienten und 39 an Leberzellkarzinom erkrankten einerseits ein eindeutig erhöhter Spiegel an z.B. Acetat, N-Acetylglycoproteinen, Pyruvat und Glutamin und auf der anderen Seite verminderte Werte von Isoleucin, Valin oder Acetoacetat gefunden werden [74]. Bei Mundhöhlenkarzinomen war nicht nur eine Unterscheidung von gesunden zu erkrankten Patienten, sondern auch eine Differenzierung der Schweregrade der Krankheit möglich [75]. Unterschiedliche Konzentrationen von Aminosäuren und Zuckern ließen auf einen gestörten Energiestoffwechsel schließen, d.h. Lipolyse, Krebszyklus und Aminosäure-Abbau. In einer Studie an 103 Patienten mit kolorektalem Adenokarzinom – davon 42 mit lokoregionärem Karzinom, 45 mit Lebermetastasen und 25 auch mit extrahepatischen Metastasen – konnte man außerdem eindeutig zwischen den verschiedenen Gruppen mittels NMR-Spektroskopie oder Gaschromatographie unterscheiden [76]. Diese Ergebnisse zeigen die universelle Einsetzbarkeit der

NMR in der Krebsforschung, was zu neuen Erkenntnissen über gestörte Stoffwechselprozesse führt. Zukünftig wird eine Früherkennung solcher Krankheiten möglicherweise schon sehr viel genauer und schneller über spezielle Signalmuster im Blut möglich sein.

## Fazit

Die NMR-Spektroskopie entwickelt sich immer mehr zu einer neuen analytischen Option zur Bestimmung kleiner Metabolite einerseits und zur differenzierten Lipoprotein-Analyse andererseits. In zahlreichen Studien unterschiedlichster Ausrichtung wurde die Methode bereits erfolgreich eingesetzt. Sie erfordert nur minimale Probenpräparation, sowie geringen Zeitaufwand und gewinnt durch die fortschreitenden Automatisierungsbemühungen zunehmend an Bedeutung im Routineeinsatz im klinischen Labor.

**Interessenkonflikt:** Die Autoren erklären, dass keine wirtschaftlichen oder persönlichen Interessenkonflikte bestehen.

## Literatur

1. Levitt MH. Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance, 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2001.
2. Keeler J. Understanding NMR spectroscopy, 1st ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2011.
3. Braun S, Kalinowski H-O, Berger S. Hundredfifty (150) and more basic NMR experiments. A practical course, 2nd ed. Weinheim, Chichester: Wiley-VCH, 1998.
4. Ludwig C, Viant MR. Two-dimensional J-resolved NMR spectroscopy: review of a key methodology in the metabolomics toolbox. Phytochem Anal 2010;21:22–32.
5. Tang H, Wang Y, Nicholson JK, Lindon JC. Use of relaxation-edited one-dimensional and two dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy to improve detection of small metabolites in blood plasma. Anal Biochem 2004;325:260–72.
6. Johnson CS. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. Prog Nucl Mag Res Sp 1999;34:203–56.
7. Liu M, Nicholson JK, Lindon JC. High-Resolution diffusion and relaxation edited one- and two-dimensional  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy of biological fluids. Anal Chem 1996;68:3370–6.
8. De Graaf RA, Behar KL. Quantitative  $^1\text{H}$  NMR Spectroscopy of blood plasma metabolites. Anal Chem 2003;75:2100–4.
9. Nicholson JK, Foxall PJ, Spraul M, Farrant RD, Lindon JC. 750 MHz  $^1\text{H}$  and  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of human blood plasma. Anal Chem 1995;67:793–811.
10. Liu M, Nicholson JK, Parkinson JA, Lindon JC. Measurement of biomolecular diffusion coefficients in blood plasma using

- two-dimensional  $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  Diffusion-edited total-correlation NMR spectroscopy. *Anal Chem* 1997;69:1504–9.
11. Kriat M, Confort-Gouny S, Vion-Dury J, Sciaky M, Viout P, Cozzone PJ. Quantitation of metabolites in human blood serum by proton magnetic resonance spectroscopy. A comparative study of the use of formate and TSP as concentration standards. *NMR Biomed* 1992;5:179–84.
  12. Kumpula LS, Kumpula JM, Taskinen M-R, Jauhainen M, Kaski K, Ala-Korpela M. Reconsideration of hydrophobic lipid distributions in lipoprotein particles. *Chem Phys Lipids* 2008;155:57–62.
  13. Lounila J, Ala-Korpela M, Jokisaari J, Savolainen MJ, Kesäniemi YA. Effects of orientational order and particle size on the NMR line positions of lipoproteins. *Phys Rev Lett* 1994;72:4049–52.
  14. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW. Quantification of plasma lipoproteins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clin Chem* 1991;37:377–86.
  15. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. *Clin Chem* 1992;38:1632–8.
  16. Hiltunen Y, Ala-Korpela M, Jokisaari J, Eskelinen S, Kiviniitty K, Savolainen M, et al. A lineshape fitting model for  $^1\text{H}$  NMR spectra of human blood plasma. *Magn Res Med* 1991;21:222–32.
  17. Ala-Korpela M, Korhonen A, Keisala J, Hörkkö S, Korpi P, Ingman LP, et al.  $^1\text{H}$  NMR-based absolute quantitation of human lipoproteins and their lipid contents directly from plasma. *J Lipid Res* 1994;35:2292–304.
  18. Ala-Korpela M, Hiltunen Y, Bell JD. Quantification of biomedical NMR data using artificial neural network analysis: Lipoprotein lipid profiles from  $^1\text{H}$  NMR data of human plasma. *NMR Biomed* 1995;8:235–44.
  19. Hiltunen Y, Heiniemi E, Alakorpela M. Lipoprotein-Lipid Quantification by neural-network analysis of  $^1\text{H}$ -NMR data from human blood plasma. *J Magn Res Ser B* 1995;106:191–4.
  20. Batten TF, Krane J, Engan T, Bjerve KS, Axelson D. Quantification of plasma lipids and apolipoproteins by use of proton NMR spectroscopy, multivariate and neural network analysis. *NMR Biomed* 2000;13:271–88.
  21. Vehtari A, Mäkinen V-P, Soininen P, Ingman P, Mäkelä SM, Savolainen MJ, et al. A novel Bayesian approach to quantify clinical variables and to determine their spectroscopic counterparts in  $^1\text{H}$  NMR metabonomic data. *BMC Bioinformatics* 2007;8:S8.
  22. Mallol R, Rodríguez MA, Heras M, Vinaixa M, Plana N, Masana L, et al. Particle size measurement of lipoprotein fractions using diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 2012;402:2407–15.
  23. Liu M, Tang H, Nicholson JK, Lindon JC. Use of  $^1\text{H}$  NMR-determined diffusion coefficients to characterize lipoprotein fractions in human blood plasma. *Magn Res Chem* 2002;40:S83–S88.
  24. Dyrby M, Petersen M, Whittaker AK, Lambert L, Nørgaard L, Bro R, et al. Analysis of lipoproteins using 2D diffusion-edited NMR spectroscopy and multi-way chemometrics. *Anal Chim Acta* 2005;531:209–16.
  25. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34:1345–53.
  26. Redgrave TG, Roberts DC, West CE. Separation of plasma lipoproteins by density-gradient ultracentrifugation. *Anal Biochem* 1975;65:42–9.
  27. Lindgren FT, Nichols AV, Upham FT, Wills RD. Subfractionation of the Sf 20–105 lipoproteins in a swinging bucket rotor. *J Phys Chem* 1962;66:2007–11.
  28. Lindgren FT, Jensen LC, Wills RD, Stevens GR. Subfractionation of Sf 4–105, Sf 4–20 and high density lipoproteins. *Lipids* 1972;7:194–201.
  29. Sata T, Estrich DL, Wood PD, Kinsell LW. Evaluation of gel chromatography for plasma lipoprotein fractionation. *J Lipid Res* 1970;11:331–40.
  30. Rudel LL, Lee JA, Morris MD, Felts JM. Characterization of plasma lipoproteins separated and purified by agarose-column chromatography. *Biochem J* 1974;139:89–95.
  31. Sata T, Havel RJ, Jones AL. Characterization of subfractions of triglyceride-rich lipoproteins separated by gel chromatography from blood plasma of normolipemic and hyperlipemic humans. *J Lipid Res* 1972;13:757–68.
  32. Nanjee MN, Brinton EA. Very small apolipoprotein A-I-containing particles from human plasma: isolation and quantification by high-performance size-exclusion chromatography. *Clin Chem* 2000;46:207–23.
  33. Thomas L. *Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik*, 7th ed. Frankfurt: Th-Books, 2007.
  34. Hidaka H, Hanyu N, Sugano M, Kawasaki K, Yamauchi K, Katayama T. Analysis of human serum lipoprotein lipid composition Using MALDI-TOF mass spectrometry. *Ann Clin Lab Sci* 2007;37:213–21.
  35. Schiller J, Zschörnig O, Petković M, Müller M, Arnhold J, Arnold K. Lipid analysis of human HDL and LDL by MALDI-TOF mass spectrometry and  $^{31}\text{P}$ -NMR. *J Lipid Res* 2001;42:1501–8.
  36. Fossel E, Carr J, McDonagh J. Detection of malignant tumors. Water-suppressed proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of plasma. *N Engl J Med* 1986;315:1369–76.
  37. Dowd TL, Kaplan BA, Gupta RK, Aisen P. Detection of malignant tumors: water-suppressed proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of plasma. *Magn Res Med* 1987;5:395–7.
  38. Holmes KT, Mackinnon WB, May GL, Wright LC, Dyne M, Tattersall MH, et al. Hyperlipidemia as a biochemical basis of magnetic resonance plasma test for cancer. *NMR Biomed* 1988;1:44–9.
  39. Lim HM, Price TB, Marsh JC, Rainey PM, Gore JC, Armitage IM. Some factors that influence the plasma lipoprotein  $^1\text{H}$  NMR spectra of normal and cancer patients: an oncolipid test? *Yale J Biol Med* 1991;64:63–77.
  40. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Hayes LW, Freedman DS, Janjan NA, Anderson T. Relationships between the proton nuclear magnetic resonance properties of plasma lipoproteins and cancer. *Clin Chem* 1991;37:369–76.
  41. Hiltunen Y, Ala-Korpela M, Jokisaari J, Eskelinen S, Kiviniitty K. Proton nuclear magnetic resonance lineshape studies on human blood plasma lipids from newborn infants, healthy adults, and adults with tumors. *Magn Res Med* 1992;26:89–99.
  42. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Cromwell WC. Measurement issues related to lipoprotein heterogeneity. *Am J Cardiol* 2002;90:22–9.
  43. Freedman DS, Bowman BA, Otvos JD, Srinivasan SR, Berenson GS. Levels and correlates of LDL and VLDL particle sizes

- among children: the Bogalusa heart study. *Atherosclerosis* 2000;152:441–9.
44. Freedman DS, Bowman BA, Srinivasan SR, Berenson GS, Otvos JD. Distribution and correlates of high-density lipoprotein subclasses among children and adolescents. *Metabolism* 2001;50:370–6.
45. Freedman DS, Bowman BA, Otvos JD, Srinivasan SR, Berenson GS. Differences in the relation of obesity to serum triacylglycerol and VLDL subclass concentrations between black and white children: the Bogalusa Heart Study. *Am J Clin Nutr* 2002;75:827–33.
46. Yu HH, Ginsburg GS, O'Toole ML, Otvos JD, Douglas PS, Rifai N. Acute changes in serum lipids and lipoprotein subclasses in triathletes as assessed by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Arterioscl Thromb Vas* 1999;19:1945–9.
47. Decewicz DJ, Neatrour DM, Burke A, Haberkorn MJ, Patney HL, Vernalis MN, et al. Effects of cardiovascular lifestyle change on lipoprotein subclass profiles defined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Lipids Health Dis* 2009;8:1–14.
48. Li Z, Otvos JD, Lamon-Fava S, Carrasco WV, Lichtenstein AH, McNamara JR, et al. Men and women differ in lipoprotein response to dietary saturated fat and cholesterol restriction. *J Nutr* 2003;133:3428–33.
49. Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, Knetzger KJ, Wharton MB, McCartney JS, et al. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 2002;347:1483–92.
50. Morris P, Bhalla N, McLain K, Malave H, Underberg J, Teague RJ, et al. Discordance in low-density lipoprotein particle number (LDL-P) and apolipoprotein B (Apo B) level. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:1145–6.
51. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, Barboriak JJ, Anderson AJ, Walker JA. Relation of lipoprotein subclasses as measured by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy to coronary artery disease. *Arterioscl Thromb Vas* 1998;18:1046–53.
52. Kuller L, Arnold A, Tracy R, Otvos J, Burke G, Psaty B, et al. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of lipoproteins and risk of coronary heart disease in the cardiovascular health study. *Arterioscl Thromb Vas* 2002;22:1175–80.
53. Blake GJ, Otvos JD, Rifai N, Ridker PM. Low-Density lipoprotein particle concentration and size as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy as predictors of cardiovascular disease in women. *Circulation* 2002;106:1930–7.
54. Kathiresan S, Otvos JD, Sullivan LM, Keyes MJ, Schaefer EJ, Wilson PW, et al. Increased small low-density lipoprotein particle number a prominent feature of the metabolic syndrome in the Framingham heart study. *Circulation* 2006;113:20–9.
55. Freedman DS, Otvos JD, Jeyarajah EJ, Shalaurova I, Cupples LA, Parise H, et al. Sex and age differences in lipoprotein subclasses measured by nuclear magnetic resonance spectroscopy: the Framingham Study. *Clin Chem* 2004;50:1189–200.
56. Mora S, Otvos JD, Rifai N, Rosenson RS, Buring JE, Ridker PM. Lipoprotein particle profiles by nuclear magnetic resonance compared with standard lipids and apolipoproteins in predicting incident cardiovascular disease in women. *Circulation* 2009;119:931–9.
57. Linsel-Nitschke P, Jansen H, Aherrahou Z, Belz S, Mayer B, Lieb W, et al. Macrophage cholesterol efflux correlates with lipoprotein subclass distribution and risk of obstructive coronary artery disease in patients undergoing coronary angiography. *Lipids Health Dis* 2009;8:14.
58. Colhoun HM, Otvos JD, Rubens MB, Taskinen MR, Underwood SR, Fuller JH. Lipoprotein subclasses and particle sizes and their relationship with coronary artery calcification in men and women with and without type 1 diabetes. *Diabetes* 2002;51:1949–56.
59. Soedamah-Muthu SS, Chang Y-F, Otvos J, Evans RW, Orchard DT. Lipoprotein subclass measurements by nuclear magnetic resonance spectroscopy improve the prediction of coronary artery disease in type 1 diabetes. A prospective report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia* 2003;46:674–82.
60. Jenkins AJ, Lyons TJ, Zheng D, Otvos JD, Lackland DT, McGee D, et al. Serum lipoproteins in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes intervention and complications cohort associations with gender and glycemia. *Diabetes Care* 2003;26:810–8.
61. Grundy SM, Vega GL, Otvos JD, Rainwater DL, Cohen JC. Hepatic lipase activity influences high density lipoprotein subclass distribution in normotriglyceridemic men: genetic and pharmacological evidence. *J Lipid Res* 1999;40:229–34.
62. Vanhala M, Kumpula LS, Soininen P, Kangas AJ, Ala-Korpela M, Kautiainen H, et al. High serum adiponectin is associated with favorable lipoprotein subclass profile in 6.4-year follow-up. *Eur J Endocrinol* 2011;164:549–52.
63. Kaess B, Fischer M, Baessler A, Stark K, Huber F, Kremer W, et al. The lipoprotein subfraction profile: heritability and identification of quantitative trait loci. *J Lipid Res* 2008;49:715–23.
64. Kaess BM, Tomaszewski M, Braund PS, Stark K, Rafelt S, Fischer M, et al. Large-scale candidate gene analysis of HDL particle features. *PLoS One* 2011;6:e14529.
65. Petersen A-K, Stark K, Musameh MD, Nelson CP, Römisch-Marg W, Kremer W, et al. Genetic associations with lipoprotein subfractions provide information on their biological nature. *Hum Mol Genet* 2012;21:1433–43.
66. Zhang A, Sun H, Wang X. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease: a systematic review. *Anal Bioanal Chem* 2012;404:1239–45.
67. Rubio-Aliaga I, Roos B, Duthie S, Crosley L, Mayer C, Horgan G, et al. Metabolomics of prolonged fasting in humans reveals new catabolic markers. *Metabolomics* 2011;7:375–87.
68. Krug S, Kastenmüller G, Stückler F, Rist MJ, Skurk T, Sailer M, et al. The dynamic range of the human metabolome revealed by challenges. *FASEB J* 2012;26:2607–19.
69. McCombie G, Browning LM, Titman CM, Song M, Shockcor J, Jebb SA, et al. w-3 oil intake during weight loss in obese women results in remodelling of plasma triglyceride and fatty acids. *Metabolomics* 2009;5:363–74.
70. Würtz P, Raiko JR, Magnussen CG, Soininen P, Kangas AJ, Tynkkynen T, et al. High-throughput quantification of circulating metabolites improves prediction of subclinical atherosclerosis. *Eur Heart J* 2012;33:2307–16.
71. Mäkinen V-P, Soininen P, Forsblom C, Parkkonen M, Ingman P, Kaski K, et al. Diagnosing diabetic nephropathy by <sup>1</sup>H NMR metabonomics of serum. *Magn Res Mater Phy* 2006;19:281–96.
72. Mäkinen V-P, Soininen P, Forsblom C, Parkkonen M, Ingman P, Kaski K, et al. <sup>1</sup>H NMR metabonomics approach to the disease continuum of diabetic complications and premature death. *Mol Sys Biol* 2008;4.

73. Brindle JT, Nicholson JK, Schofield PM, Grainger DJ, Holmes E. Application of chemometrics to  $^1\text{H}$  NMR spectroscopic data to investigate a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension. *Analyst* 2003;128: 32–6.
74. Gao H, Lu Q, Liu X, Cong H, Zhao L, Wang H, et al. Application of  $^1\text{H}$  NMR-based metabolomics in the study of metabolic profiling of human hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis. *Cancer Science* 2009;100:782–5.
75. Tiziani S, Lopes V, Gunther UL. Early stage diagnosis of oral cancer using  $^1\text{H}$  NMR-based metabolomics. *Neoplasia* 2009;11:269–76.
76. Farshidfar F, Weljie AM, Kopciuk K, Buie WD, MacLean A, Dixon E, et al. Serum metabolomic profile as a means to distinguish stage of colorectal cancer. *Genome Med* 2012;4:42.